

第一鳃弓外胚间充质细胞定向脂肪细胞的分化★

侯景秋^{1,2}, 闫征斌^{1,2}, 杨旭²

Directed differentiation of ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch into adipocytes

Hou Jing-qiu^{1,2}, Yan Zheng-bin^{1,2}, Yang Xu²

Abstract

BACKGROUND: During the dentofacial development, the first branchial arch, as a transitional structure, plays an important role.

OBJECTIVE: To investigate the self-renewal of ectomesenchymal cells (EMCs) isolated from the first branchial arch as well as the feasibility of inducing EMCs into adipocytes.

METHODS: The activity of proliferation and self-renewal of EMCs were detected by nuclei labeled with BrdU and fluorescence *in situ* hybridization for telomerase. Monolayer cultures of EMCs were passaged 3 times and then transferred to adipogenic media. The level of differentiation was evaluated by histological examination and the expression of tissue-specific genes was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction technique.

RESULTS AND CONCLUSION: Nuclei labeled with BrdU and fluorescence *in situ* hybridization for telomerase were positive. After being cultured in adipogenesis-inducing medium, EMCs responded by the accumulation of lipid vacuoles and the gene expression of LPL. The findings indicate that EMCs have a high activity of proliferation and self-renewal, and they are capable of differentiation into adipocytes *in vitro*.

Hou JQ, Yan ZB, Yang X. Directed differentiation of ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch into adipocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(19): 3559-3562. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 第一鳃弓作为过渡结构, 在牙颌面的发育形成过程中, 发挥着重要作用。

目的: 观察第一鳃弓外胚间充质细胞自我更新能力, 以及体外诱导分化成为脂肪细胞的可能性。

方法: 分离培养 E9.5 Balb/c 胎鼠第一鳃弓外胚间充质细胞, 以端粒酶原位杂交和 BrdU 渗入实验检测外胚间充质细胞的增殖能力。相差显微镜下观察细胞形态变化和生长规律, 免疫细胞化学染色鉴定细胞表面标志, cDNA 探针原位杂交、免疫荧光化学染色观察细胞增殖能力, 油红 O 染色、RT-PCR 产物凝胶电泳观察细胞成脂诱导结果。

结果与结论: 端粒酶原位杂交和 BrdU 摄取实验阳性, 诱导后细胞表现出典型的脂肪细胞形态, 大部分细胞油红 O 染色阳性, RT-PCR 结果显示诱导后细胞表达了脂蛋白脂酶。提示第一鳃弓外胚间充质细胞具有较高的自我更新能力, 并可定向诱导分化成为脂肪细胞。

关键词: 第一鳃弓; 间充质细胞; 诱导; 分化; 脂肪细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.19.033

侯景秋, 闫征斌, 杨旭. 第一鳃弓外胚间充质细胞定向脂肪细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(19):3559-3562. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

第一鳃弓外胚间充质细胞在生理条件下可分化形成颅颌面部多种组织发生的前体细胞^[1-3], 如: 神经节、神经元细胞、色素细胞、成骨细胞、成软骨细胞、成牙本质细胞及成牙骨质细胞等, 参与形成颅骨、上下颌骨、牙体(釉质除外)牙周组织。

近些年来, 对于与牙齿发生、发育相关的颅神经嵴细胞、牙乳头细胞、恒牙髓和乳牙髓等细胞的生物学特性方面都有了较多的研究成果, 而对于第一鳃弓外胚间充质细胞的细胞生物学研究还比较少。

本实验旨在利用第一鳃弓外胚间充质细胞体外培养模型, 在一定外源活性物质刺激的条

件下, 进行定向诱导, 对其增殖特性和分化特性进行研究, 为牙颌面多组织器官的分化、发育及基因调控研究提供实验依据。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 2005-01/2007-12在四川大学华西口腔医学院重点实验室和大庆油田总医院中心实验室完成。

材料: 孕9.5 d(E9.5) Balb/c小鼠, 由四川大学实验动物中心提供, 动物质量合格证号: SCXK(川)2005-0002。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[4]。

¹Department of Stomatology, Daqing Oil Field General Hospital, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China;
²College of Stomatology, Jiamusi University, Jiamusi 154004, Heilongjiang Province, China

Hou Jing-qiu★, Master, Associate chief physician, Department of Stomatology, Daqing Oil Field General Hospital, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China; College of Stomatology, Jiamusi University, Jiamusi 154004, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Yan Zheng-bin, Doctor, Associate chief physician, Department of Stomatology, Daqing Oil Field General Hospital, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China; College of Stomatology, Jiamusi University, Jiamusi 154004, Heilongjiang Province, China yanzhengbin@163.com

Received: 2010-11-02
Accepted: 2010-12-11

¹ 大庆油田总医院口腔科, 黑龙江省大庆市 163001, ² 佳木斯大学口腔医学院, 黑龙江省佳木斯市 154004

侯景秋★, 女, 1971年生, 河北省宁河县人, 汉族, 2005年四川大学华西口腔医学院毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事口腔颌面部发育及修复重建的研究。

通讯作者: 闫征斌, 博士, 副主任医师, 大庆油田总医院口腔科, 黑龙江省大庆市 163001, 佳木斯大学口腔医学院, 黑龙江省佳木斯市 154004 yanzhengbin@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)19-03559-04

收稿日期: 2010-11-02
修回日期: 2010-12-11 (20101102025/W -W)

主要试剂:

主要试剂	来源
胎牛血清(FBS)、100 u/mL 青链霉素、2.5 u/mL 两性霉素、白血病抑制因子(LIF)	GIBCO 公司, 美国
β-磷酸甘油钠, 地塞米松, L-抗坏血酸, VitD3	SIGMA 公司
端粒酶(TERT)原位杂交检测试剂盒、FITC 荧光标记羊抗鼠 IgG 二抗	博士德生物工程公司
鼠抗 I 型胶原单抗、5'-溴尿嘧啶核苷(bromo-5'-deoxyuridine, BrdU)、鼠抗 BrdU 单克隆抗体、鼠抗波形蛋白单克隆抗体(Vimentin)、抗角蛋白多抗 (cytokeratin, CK)、鼠抗 CD57/HNK-1 单克隆抗体	中山生物工程公司

实验方法:

第一鳃弓外胚间充质细胞的分离培养及鉴定^[5]:

显微解剖E9.5胎鼠第一鳃弓, 采用酶消化法对其进行培养, 特异性标记物CD57/HNK1、波形蛋白免疫细胞化学染色呈均一表达。

检测外胚间充质细胞的自我更新能力和增殖活性:

BrdU渗入实验: 取第3代细胞, 调细胞浓度为 $1 \times 10^8 L^{-1}$, 以1mL/孔单细胞悬液接种于6孔培养板, 加含5 μmol/L BrdU的条件培养基, 培养48 h后终止培养, PBS洗涤细胞爬片, 40 g/L多聚甲醛固定20 min, 山羊血清孵育30 min封闭非特异性抗原, 加1:400的鼠抗BrdU单克隆抗体37 °C孵育1 h, 加FITC标记的羊抗鼠二抗, 37 °C孵育1 h后PBS冲洗, PBS代替BrdU一抗作为空白对照。

端粒酶原位杂交: 将第3代细胞爬片置于PBS中漂洗, 含有0.1%DEPC的40 g/L多聚甲醛4 °C固定1 h, 按原位杂交试剂盒所附说明操作, 检测端粒酶mRNA表达。

第一鳃弓外胚间充质细胞向脂肪细胞诱导分化: 取第3代生长状态良好的外胚间充质细胞, 加入2.5 g/L胰蛋白酶, 两分钟即可见细胞回缩脱壁, 再加入等量的含血清培养液, 轻轻吹打培养瓶底, 收集细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 用不含LIF的DMEM/F12培养液再悬细胞, 以 $1 \times 10^8 L^{-1}$ 的细胞浓度接种入预置盖玻片的6孔培养板中, 在实验孔中加入脂肪细胞分化条件培养液, 其中含有10 mg/L胰岛素、1 μmol/L地塞米松、0.25 mmol/L 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(IBMx)和100 μmol/L吡啶美辛; 对照孔加常规培养基, 同时, 将生长于两个100 mL培养瓶中的第3代细胞也作同样的处理, 两三天

换液1次。

成脂诱导1周后, 油红O染色, 了解脂肪滴形成情况。从6孔板内取出细胞爬片, 浸入60%磷酸三乙酯液中洗5~10 s; 在油红O染液中染10 min; 60%磷酸三乙酯液中洗15~30 s, 蒸馏水洗15~30 s; 苏木精复染30 s, 自来水洗5 min; 甘油明胶封固。

RT-PCR检测脂蛋白脂酶 mRNA的表达: 在100 mL培养瓶内细胞成脂诱导1周后, 弃培养液, PBS清洗2次, 加入2 mL TRIZOL, 裂解细胞, 提取诱导组和对照组的总RNA, 分光光度计检测两组细胞A₂₆₀/A₂₈₀值为1.80、1.82。根据Gene Bank数据库脂蛋白脂酶的mRNA序列, 设计PCR扩增的两条引物:

脂蛋白脂酶:

正义链5' -ATG GAG AGC AAA GCC CTG CTC-3'
反义链5' -GTT AGG TCC AGC TGG ATC GAG-3'
预期产物为569 bp

GAPDH:

正义链5' -GGT CGG AGT CAA CGG ATT TG-3'
反义链5' -ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3'
预期产物为350 bp

每个反应体系加入1 μg RNA, 反应条件如下: 50 °C反转录30 min。然后94 °C变性1 min, 56 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 30个循环, 最后在72 °C延伸10 min。

主要观察指标: ①相差显微镜下观察细胞形态变化和生长规律。②免疫细胞化学染色鉴定细胞表面标志。③cDNA探针原位杂交、免疫荧光化学染色观察细胞增殖能力。④油红O染色、RT-PCR产物凝胶电泳观察细胞成脂诱导结果。

2 结果

2.1 原代细胞生长情况 培养20 min后可见大部分原代细胞贴壁, 2 h后, 细胞开始伸展, 24 h后贴壁细胞已经完全舒展, 细胞呈梭形和多角形, 2~4个细胞突起, 胞体丰满, 单细胞核细胞居多, 核大, 卵圆形, 位于胞体中央。3 d后, 细胞即可长满瓶底的90%, 1:2消化传代, 细胞形态无明显变化。

2.2 第一鳃弓外胚间充质细胞鉴定结果 CD57、Vimentin染色, 胞浆呈阳性着色, 而CK为阴性。

2.3 端粒酶原位杂交和BrdU渗入实验结果 见图1, 2。

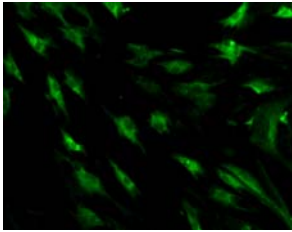


Figure 1 Ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch labeled with fluorescence *in situ* hybridization for telomerase are positive ($\times 200$)

图1 第一鳃弓外胚间充质细胞端粒酶原位杂交阳性($\times 200$)

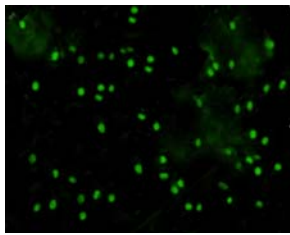


Figure 2 Ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch labeled with BrdU are positive ($\times 100$)

图2 第一鳃弓外胚间充质细胞抗 BrdU 阳性($\times 100$)

第3代外胚间充质细胞端粒酶荧光cDNA探针原位杂交阳性,以PBS代替探针的对照组结果为阴性。第一鳃弓外胚间充质细胞经BrdU孵育48 h后,免疫荧光化学标记呈胞核阳性。

2.4 成脂诱导结果 外胚间充质细胞在加入诱导液后第2, 3天,观察发现细胞中即有发亮的空泡形成。随着时间延长含有空泡的细胞数量逐渐增多,而且空泡逐渐融合、增大,占据细胞胞浆的大部分,细胞核被推移到细胞的边缘,7 d左右空泡细胞可连接成片,见图3。

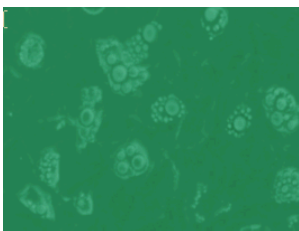


Figure 3 At 7 d of adipogenic induction, ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch presented with fused and enlarged vacuoles accounting for most of the cytoplasm ($\times 200$)

图3 第一鳃弓外胚间充质细胞成脂诱导7 d后,空泡逐渐融合、增大,占据细胞胞浆的大部分($\times 200$)

油红O染色阳性,证实细胞中的空泡为脂滴。对照组细胞仍为梭形和多角形,未见到脂肪滴出现。见图4。

RT-PCR产物凝胶电泳显示诱导前外胚间充质细胞没有脂蛋白脂酶 mRNA的表达,泳道内没有见到条带出现,诱导后在500~600 bp之间见到明亮清晰条带,证明细胞表达脂蛋白脂酶 mRNA;另外,诱导前、后

的细胞看家基因GAPDH在约350 bp处均见到明亮清晰条带。见图5。

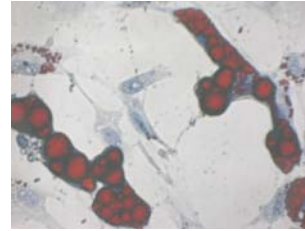
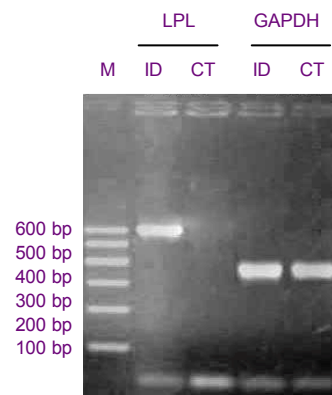


Figure 4 Vacuoles were positive for oil red O after adipogenic induction ($\times 200$)

图4 第一鳃弓外胚间充质细胞成脂诱导后,细胞内发亮空泡油红O染色阳性($\times 200$)



M: marker

Figure 5 Gel electrophoresis of LPL mRNA RT-PCR products after adipogenic induction

图5 成脂诱导后,LPL mRNA RT-PCR 产物凝胶电泳

3 讨论

对牙胚发育生物学的研究证实,作为一种多能干细胞,颅神经嵴细胞在其牙向分化过程中,先后经历鳃弓向/牙向两次关键性级联分化^[6]。颅神经嵴细胞从第4体节到第29体节期间,不断地自中脑后份和后脑前份(亦称为菱脑第1、2原节)以束状细胞群的方式,向腹外侧迁移至第一鳃弓,并演化为外胚间充质细胞^[7];然后外胚间充质细胞进一步分化、增殖形成上、下颌骨及除牙釉质外的牙体组织(牙本质、牙骨质和牙髓)和牙周组织(牙槽骨、牙周膜)^[8-10]。因此,第一鳃弓作为过渡结构,在牙颌面的发育形成过程中,发挥着不可替代的重要作用。

体外培养的第一鳃弓外胚间充质细胞呈梭形、多角形,核大、胞体丰满,单细胞核细胞居多,核大,卵圆形,位于胞体中央。CD57染色阳性,说明该细胞是由神经嵴细胞分化发育而来,因为有研究表明CD57是神经嵴源性细胞的特异性标志,被用来追踪神经嵴细胞的分化^[11-12]。抗Vimentin染色为阳性,抗CK染色为阴性,说明细胞来自于外胚间充质^[13-14]。

端粒酶的表达可以反映细胞的增殖和自我更新能力^[15-17], 端粒酶是一种能延长端粒末端并保持端粒长度的核酸蛋白酶, 由蛋白质和RNA组成, 可以由自身的内源性RNA为模板, 发挥RNA 指导DNA的合成作用, 向端粒末端添加(TTAGGG) n 序列, 使端粒延长, 延长细胞的寿命^[18-21]。本实验应用原位杂交法检测了第3代第一鳃弓外胚间充质细胞端粒酶活性, 结果细胞呈阳性反应, 这说明外胚间充质细胞分化程度较低或处于未分化阶段, 具有较强的增殖、自我更新能力。

同时, 本实验还利用细胞在分裂增殖过程中可以吸收BrdU而合成自身核苷酸的原理^[22-23], 验证了第一鳃弓外胚间充质细胞的增殖能力, 结果显示大部分细胞BrdU染色阳性, 说明细胞处于细胞周期的S期^[24], DNA合成旺盛, 细胞为分裂增殖而产生的新生细胞, 且在不断分裂增殖过程中依旧维持了这种能力。

外胚间充质细胞在胰岛素、地塞米松、1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(IBMx)和吡啶美辛的刺激作用下^[25], 第3天细胞中出现了圆形发亮的液滴空泡, 第7天大部分细胞都发生了类似的形态改变, 油红O染色阳性(油红O是一种人工合成染料, 能溶解于脂类物质, 使脂质呈色)证实发亮的空泡为脂肪滴; 同时, RT-PCR产物电泳也显示诱导后细胞表达了脂蛋白脂酶, 脂蛋白脂酶是成熟脂肪细胞的特异性分子标记物^[26]。以上结果证实, 外胚间充质细胞在一定外源性活性物质的诱导下, 可以定向分化为脂肪细胞。脂肪细胞的分化是由几个转录因子协同调节的^[26], 其中最主要的是C/EBP(CAAT/enhancer binding protein)家族和PPAR(peroxisome proliferator activated receptor)家族的转录调控因子。在诱导液成份中, 地塞米松激活核激素受体超家族成员糖皮质激素受体, 诱导C/EBP δ 的产生, 同时降低脂肪细胞分化抑制因子pref-1的表达。IBMx是磷酸二酯酶的特异性抑制剂, 通过抑制cAMP的降解而提高细胞内cAMP的水平。后者通过激活cAMP反应元件结合蛋白(CREB)来调控C/EBP α 和C/EBP β 的表达, 促进脂肪细胞的产生。胰岛素与IGF-1受体结合, 也可通过调节ERK1/ERK2信号传导途径以及降低核蛋白磷酸酶PP2A的活性来调节CREB的磷酸化和转录活性, 以促进C/EBP的表达, 并增强PPAR γ 2的表达。

4 参考文献

[1] Yashida T, Vivatbutsi P, Gillian MK, et al. Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech Dev.* 2008;125(9-10):797-808.
 [2] Alexander T, Nolte C, Krumlauf R. Hox gene and segmentation of the hindbrain and axial skeleton. *Rev Cell Dev Biol.* 2009;25(1):431-456.
 [3] McBratney-Owen B, Iseki S, Bamforth SD, et al. Development and tissue origins of the mammalian cranial base. *Dev Biol.* 2008;322(1):121-132.
 [4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.
 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

[5] Yan ZB, Hou JQ, Yan XD, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(32):5983-5987.
 闫征斌, 侯景秋, 闫雪丹, 等. 第一鳃弓外胚间充质细胞体外培养模型的构建[J]. 中国组织工程研究与临床康复杂志, 2010, 14(32):5983-5987.
 [6] Sharpe PT. Neural crest and tooth morphogenesis. *Adv Dent Res.* 2001;15:4-7.
 [7] Paul AT, Dorothy S. Signalling between the hindbrain and paraxial tissues dictates neural crest migration pathways. *Development.* 2002;129:433-442.
 [8] Bentic A, Tandon P, Payton S, et al. The emergence of ectomesenchyme. *Dev Dyn.* 2008;237(3):592-601.
 [9] Gross JB, Hanken J. Review of fate-mapping studies of osteogenic cranial neural crest in vertebrates. *Dev Biol.* 2008;317(2):389-400.
 [10] Le Douarin NM, Brito JM, Creuzet S. Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Res Rev.* 2007;55(2):237-247.
 [11] Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, et al. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontol Res.* 2006;43(5):531-536.
 [12] Cheung M, Briscoe J. Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9. *Development.* 2003;130(23):5681-5693.
 [13] Yan Z, Lin Y, Jiao X, et al. Characterization of ectomesenchymal cells isolated from the first branchial arch during multilineage differentiation. *Cells Tissues Organs.* 2006;183(3):123-132.
 [14] Lin Y, Yan Z, Liu L, et al. Proliferation and pluripotency potential of ectomesenchymal cells derived from first branchial arch. *Cell Prolif.* 2006;39(2):79-92.
 [15] Pathak S. Organ- and tissue-specific stem cells and carcinogenesis. *Anticancer Res.* 2002;22(3):1353-1356.
 [16] Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2001;19(3):193-204.
 [17] Sung HJ, Hong SC, Yoo JH, et al. Stemness evaluation of mesenchymal stem cells from placentas according to developmental stage: comparison to those from adult bone marrow. *J Korean Med Sci.* 2010;25(10):1418-1426.
 [18] Flores I, Blasco MA. The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett.* 2010;584(17):3826-3830.
 [19] Zhao X, 18. Malhotra GK, Lele SM, et al. Telomerase-immortalized human mammary stem/progenitor cells with ability to self-renew and differentiate. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(32):14146-14151.
 [20] Tsai CC, Chen CL, Liu HC, et al. Overexpression of hTERT increases stem-like properties and decreases spontaneous differentiation in human mesenchymal stem cell lines. *J Biomed Sci.* 2010;17:64.
 [21] Luo CX, Jin X, Cao CC, et al. Bidirectional regulation of neurogenesis by neuronal nitric oxide synthase derived from neurons and neural stem cells. *Stem Cells.* 2010;28(11):2041-2052.
 [22] Wojciechowski AB, Englund U, Lundberg C, et al. Long term survival and glial differentiation of the brain2derived precursor cell line RN33B after subretinal transplantation to adult normal rats. *Stem Cells.* 2002;20(2):163-172.
 [23] Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, et al. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science.* 2009;324(5934):1576-1580.
 [24] Ye W, Abu AF, Liu ZJ. Assessment of cell proliferation and muscular structure following surgical tongue volume reduction in pigs. *Cell Prolif.* 2010;43(6):562-572.
 [25] Wabitsch M, Heinze E, Hauner H, et al. Biological effects of human growth hormone in rat adipocyte precursor cells and newly differentiated adipocytes in primary culture. *Metabolism.* 1996;45(1):34-42.
 [26] Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998;78(3):783-809.

来自本文课题的更多信息—

作者贡献: 实验设计为第一、二作者, 干预实施为第一、二作者, 评估为第三作者。实验者均经过细胞生物学、分子生物学等正规培训, 采用盲法评估。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

创新性说明: 实验证实第一鳃弓外胚间充质细胞具有较高的自我更新能力, 并可定向诱导分化成为脂肪细胞, 具有一定的理论创新性。